

Corres. to USP 4,735,907

D3

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

昭61-218945

⑬ Int. Cl.⁴

G 01 N 33/545
C 08 F 8/00
C 08 G 81/00
G 01 N 33/543

識別記号

庁内整理番号

A-7906-2G
7167-4J
2102-4J
J-7906-2G
D-7906-2G

⑭ 公開 昭和61年(1986)9月29日

審査請求 未請求 発明の数 5 (全12頁)

⑮ 発明の名称 安定な螢光希土類元素標識及び要素された生理学的に反応性の種

⑯ 特 願 昭61-58450

⑰ 出 願 昭61(1986)3月18日

優先権主張 ⑱ 1985年3月18日 ⑲ 米国(US) ⑳ 713202

㉑ 発 明 者 ジェイムス ロバート アメリカ合衆国、ニューヨーク 14526, ペンフィールド, ジャクソン ロード イーエックスステイ. 49. ,
シエイファア
㉒ 発 明 者 ツアン ジャン チェ アメリカ合衆国、ニューヨーク 14618, ロチエスター, ウォーレン アベニュー 475
㉓ 発 明 者 マイケル アラン シ アメリカ合衆国、ニューヨーク 14895, ウェールズビル
エン ルーラル フリー デリバリー 2
㉔ 出 願 人 イーストマン コダック アメリカ合衆国、ニューヨーク, ロチエスター, ステイト
ク カンパニー ストリート 343
㉕ 代 理 人 弁理士 青 木 朗 外4名

明 細 書

1. 発明の名称

安定な螢光希土類元素標識及び標識された
生理学的に反応性の種

2. 特許請求の範囲

1. 不連続相及び水相を有する充填可能なラテ
ックスから誘導されたポリマー粒子を含み、不連
続相が

(a) 疎水性で、重合可能なエチレン性不飽和モノ
マーから誘導された繰り返し単位50～96重
量%、

(b) 非イオン性、親水性で、重合可能なエチレ
ン性不飽和モノマーから誘導された繰り返し単位
2～30重量%、並びに

(c) 少なくとも1個の可溶化基を含む陰イオン
性で、重合可能なエチレン性不飽和モノマーから
誘導された繰り返し単位2～20重量%
を含むポリマーから実質的に成るものである螢光
標識。

2. 不連続相及び水相を有する充填可能なラテ

ックスから誘導されたポリマー粒子を含み、不連
続相が

(a) 疎水性で、重合可能なエチレン性不飽和モノ
マーから誘導された繰り返し単位50～96重
量%、

(b) 非イオン性、親水性で、重合可能なエチレ
ン性不飽和モノマーから誘導された繰り返し単位
2～30重量%、並びに

(c) 少なくとも1個の可溶化基を含む陰イオン
性で、重合可能なエチレン性不飽和モノマーから
誘導された繰り返し単位2～20重量%
を含むポリマーから実質的に成るものである螢光
標識に結合された生理学的に反応性の種を含む、
螢光標識された生理学的に反応性の種。

3. 不連続相及び水相を有する充填可能なラテ
ックスから誘導されたポリマー粒子を含み、不連
続相が

(a) 疎水性で、重合可能なエチレン性不飽和モノ
マーから誘導された繰り返し単位50～96重
量%、

(b) 非イオン性、親水性で、重合可能なエチレン性不飽和モノマーから誘導された繰り返し単位 2 ~ 30 重量%、並びに

(c) 少なくとも 1 個の可溶化基を含む陰イオン性で、重合可能なエチレン性不飽和モノマーから誘導された繰り返し単位 2 ~ 20 重量%

を含むポリマーから実質的に成るものである蛍光標識に結合された生理学的に反応性の種を含む、蛍光標識された生理学的に反応性の種を含む乾式分析要素。

4. 不連続相及び水相を有する充填可能なラテックスから誘導されたポリマー粒子を含み、不連続相が

(a) 疎水性で、重合可能なエチレン性不飽和モノマーから誘導された繰り返し単位 50 ~ 96 重量%、

(b) 非イオン性、親水性で、重合可能なエチレン性不飽和モノマーから誘導された繰り返し単位 2 ~ 30 重量%、並びに

(c) 少なくとも 1 個の可溶化基を含む陰イオン

2 ~ 30 重量%、並びに

(c) 少なくとも 1 個の可溶化基を含む陰イオン性で、重合可能なエチレン性不飽和モノマーから誘導された繰り返し単位 2 ~ 20 重量%

を含むポリマーから実質的に成るものである、水性液体中の免疫反応性リガンドの測定方法。

3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は、生物医学的研究及び臨床化学に有用な蛍光標識 (label) 及び蛍光標識された、生理学的に反応性の種に関する。これらの標識及び標識された種は、特に、ヒトの生物学的液体中の特異結合リガンド、例えばハプテンを測定するため、特異結合分析、例えば免疫分析に有用である。

(従来の技術)

医学及び臨床化学の分野において、低濃度の観察すべき物質の検出又は分離を容易にする標識を使用して、生理学的に反応性の種、例えば細胞、

性で、重合可能なエチレン性不飽和モノマーから誘導された繰り返し単位 2 ~ 20 重量%

を含むポリマーから実質的に成るものである、蛍光標識された、特異結合リガンドアナログを含む、免疫分析において免疫反応性リガンドを測定する乾式分析要素。

5. A. リガンドに対するレセプターの存在下に、不連続相及び水相を有する充填可能なラテックスから誘導されたポリマー粒子を含む、蛍光標識された免疫反応性リガンドアナログと液体試料とを接触させて、レセプターとリガンドアナログとの複合体を形成させ、そして

B. リガンドアナログを蛍光分析により検出することを含んで成り、

前記不連続相が

(a) 疎水性で、重合可能なエチレン性不飽和モノマーから誘導された繰り返し単位 50 ~ 96 重量%、

(b) 非イオン性、親水性で、重合可能なエチレン性不飽和モノマーから誘導された繰り返し単位

蛋白質、酵素、補助因子、核酸、基質、抗原、抗体等の研究及び測定が多数なされている。このような用途の一つにおいて、競合結合原理を利用する特異結合分析に標識された物質を使用して、ヒト及び動物における病状の診断及び薬剤又は麻酔剤の検出がしばしば実施される。

標識を使用する場合には、測定される生物学的種が一般に低濃度であるため、感度が極めて重要である。放射性標識を使用して実施する操作は、一般には、多数の低濃度の被分析物には十分な感度を有しない。更に、放射性標識は、短い使用可能期間及び取り扱いの危険という欠点を有する。

最も高感度で、多様性のある光学的分析技術の一つである蛍光分光分析は、他の標識技術の欠点を克服するために、最近ますます普及してきた。蛍光分光分析においては、蛍光種を含む試料を目標蛍光種の励起スペクトル内の公知スペクトル分布の光で照射する。蛍光目標分子の生ずる特異的発光スペクトルの強度を測定し、試料中の目標分子の数に相関させる。蛍光分光分析は、蛋白質の

構造、細菌の細胞壁反応及び酵素の配座変化の研究並びに特異結合分析における免疫反応性リガンドの測定に広範に使用される。

充填可能なラテックスのポリマー粒子中に希土類元素のキレートを混入して含む蛍光標識は、米国特許第4,259,313号及び同第4,283,382号明細書に記載されている。これらの標識は、改良された蛍光効率を示し、免疫分析に特に有用である。ポリマー粒子は、これに直接結合する、免疫反応性種に対するキャリアとして作用する。

(発明が解決しようとする問題点)

前記の標識は、臨床化学において進歩をもたらすが、水溶液中で更に安定なものにする必要がある。前記の標識は、自然に凝集し、溶液から析出しやすい。従って、これらの貯蔵可能時間は、短い。また、これらは、分析の間に早期に凝集する傾向がある。

以下余白

に関する。

更に、乾式分析要素は、更に前記のポリマーから実質的に成る不連続相及び水相を有する充填可能なラテックスから誘導されたポリマー粒子を含む、蛍光標識された、生理学的に反応性の種を含む。

更に詳しくは、免疫分析において、免疫反応性リガンドを測定する乾式分析要素は、前記のポリマーから実質的に成る不連続相及び水相を有する充填可能なラテックスから誘導されたポリマー粒子を含む蛍光標識された、特異結合リガンドアナログを含む。

水性液体中の免疫反応性リガンドの測定方法は、

A. リガンドに対するレセプターの存在下に、不連続相及び水相を有する充填可能なラテックスから誘導されたポリマー粒子を含む、蛍光標識された免疫反応性リガンドアナログと液体試料を接触させて、レセプターとリガンドアナログとの複合体を形成させ、そして

B. リガンドアナログを蛍光分析により検出

(問題点を解決するための手段)

前記の問題点は、不連続相及び水相を有する充填可能なラテックスから誘導されたポリマー粒子を含み、該不連続相が

(a) 疎水性で、重合可能なエチレン性不飽和モノマーから誘導された繰り返し単位50~96重量%、

(b) 非イオン性、親水性で、重合可能なエチレン性不飽和モノマーから誘導された繰り返し単位2~30重量%、並びに

(c) 少なくとも1個の可溶化基を含む陰イオン性で、重合可能なエチレン性不飽和モノマーから誘導された繰り返し単位2~20重量%

を含むポリマーから実質的に成るものである蛍光標識を用いることによって、解決される。

本発明は、更に、不連続相及び水相を有する充填可能なラテックスから誘導されたポリマー粒子を含み、不連続相が前記のポリマーから実質的に成るものである生理学的に反応性の種を含む、蛍光標識された、生理学的に反応性の種(species)

することを含んでなり、

前記不連続相は前記のポリマーから実質的に成る。

更に詳しくは、本発明の蛍光標識は、種々の生物医学的研究及び臨床化学上の測定のため、プローブ又は標識物質として使用される。これらは、細胞、又は蛋白質、核酸(例えばDNA)、酵素、酵素基質、補助因子、ウイルス、白血球、成長因子、レクチン、抗原、抗体、ハプテン、代謝産物、ホルモン、毒素、放射性同位元素及び他の当業者に公知のものを含めて他の生理学的に反応性の種を標識するため使用することができる。このような生物学的物質に適当な方法、例えば共有結合又は吸収によって標識を結合させることができる。

標識は、被分析物(即ち、免疫反応性種)を測定する特異結合分析に特に有用である。これらの分析法においては、測定すべき種を標識に結合させ、標識された種を共通の反応体との反応に関して試験試料からの未標識種と競合させる。測定すべき被分析物をリガンドと言い、標識された被分

析物をリガンドアナログと言う。リガンド及びリガンドアナログを特異的に認識し、反応してこれらと複合体を形成する化合物をレセプターと言う。

この種の分析法の一つを実施する際には、リガンドは、レセプターに結合するため、リガンドアナログと競合する。未知濃度のリガンドを、標識リガンドアナログの測定された信号から推測する。複合体形成反応は下記のように進行する：
 リガンド + 標識リガンドアナログ + レセプター
 ⇌ リガンド-レセプター

+ 標識リガントアナログ-レセプター

本発明の好ましい実施態様においては、リガンドは抗原又は抗体であり、標識リガンドアナログは標識抗原又は抗体であり、特異結合分析は免疫分析である。下記の記載及び実施例の記載は、特に、これらの好ましい実施態様に関するものであるが、本発明の範囲は、他の任意の特異結合分析を含む。

本発明の標識は、希土類キレートを含むラテッ

ナントロリンイソチオシアネート等)を含む。他のキレート化剤は当業者に公知である。1, 3-ジケトン類が好ましい。

本発明の標識は、充填可能な(loadable)ラテックスを用いて製造される。本発明に有用なラテックスの“充填”についての詳細は、前記の米国特許第4,259,313号及び同第4,283,382号明細書に記載されている。一般に、水と混和しうる溶剤中のキレートの溶液の親水性を未凝固で、未溶解の、充填可能なポリマーラテックス粒子の存在で、キレートが水と混和しうる溶剤中に実質的に溶解しない点に徐々に増大することによって、キレートをポリマー粒子中に混入する。この方法で、7.5%以下(ポリマーの重量に基づいて)のキレートをポリマー粒子中に混入又は吸収させることができる。ポリマー粒子中のキレートの濃度は、所定の標識の特定の用途に応じてある程度変動することができる。本発明の蛍光標識の製造を、下記の例1に記載する。

本発明に有用な充填可能なポリマーラテックス

クスポリマー粒子を含む。これらの標識は、“水-安定性”(本明細書においては、キレートの蛍光が水性環境で消滅しないことを意味する)である。

一般に、蛍光性を示す任意の蛍光希土類キレートが、本発明の実施に有用である。特に、キレートは、希土類金属(即ち、ランタニド金属)、例えばユーロビウム又はテルビウムを含む。ユーロビウムが最も好ましい。

前記キレートは、更に適当なキレート化剤を含む。特に有用なキレート化剤は、1, 3-ジケトン類(例えばアセチルアセトネート、p-ベンゾイルアセトネート、p-ベンゾイルベンゾエート、トリフルオロ-2-フリルアセチルアセトネート等)、フタレート、ナフトエート(例えばジナフトイルメチド等)、ジピリジン類(例えば2, 2'-ジピリジン-1, 1'-ジオキシド、4, 4'-ジメチル-2, 2'-ジピリジン等)、テルピリジン類(例えば2, 2', 6', 2"-テルピリジン等)及びフェナントロリン類(例えばo-フェ

は、下記の重合可能なエチレン性不飽和モノマーから製造されたポリマーの1種以上から実質的に成るポリマー不連続相(粒子)及び水相を含む。これらのラテックスのポリマー粒子は、一般に、0.01~2 μ m、好ましくは0.1~0.5 μ mの平均粒径を有する。

ポリマー粒子は、下記の成分から成るコポリマーである：

- (a) 1種以上の疎水性で、重合可能なエチレン性不飽和モノマーから誘導された繰返し単位50~96重量%、好ましくは75~92重量%、
- (b) 1種以上の非イオン性、親水性で、重合可能なエチレン性不飽和モノマーから誘導された繰返し単位2~30重量%、好ましくは5~15重量%、並びに
- (c) 1種以上の、少なくとも1個の可溶化基を含む陰イオン性で、重合可能なエチレン性不飽和モノマーから誘導された繰返し単位2~20重量%、好ましくは3~10重量%。

前記群(a)の有用な疎水性モノマーは、ビニ

ル芳香族物質、例えば置換若しくは非置換スチレン及びビニルナフタリン、及びアクリル酸及びメタクリル酸アルキルエステルを含む。置換又は非置換スチレンが好ましい。代表的モノマーは、スチレン、 α -メチルスチレン、*p*-プロモスチレン、ビニルトルエン、1-ビニルナフタリン、アクリル酸メチル、メタクリル酸メチル、メタクリル酸エチル、アクリル酸*n*-ブチル、アクリル酸プロピル及び他の、当業者に公知のものを含む。これらのモノマーは、疎水性（水にほとんど不溶性であることを意味する、即ち、水1mlに30mg未満しか溶けないことを意味する）である。スチレン及びビニルトルエンは、特に有用なモノマーである。

前記群(b)のモノマーは、非イオン性であるが、親水性である。即ち、これらは水溶性又は水分散性（例えば水1mlに100mgより多量分散する）である。これらは、一般に、可溶化する、帯電していない基、例えばヒドロキシ基、アミド基（置換若しくは非置換）、環状アミド、スルホン

アミド等を1個以上有する。代表的モノマーは、アクリルアミド、メタクリルアミド、*N*-イソプロピルアクリルアミド、2-ヒドロキシエチルアクリレート、2-ヒドロキシプロピルメタクリレート、2-アクリルアミド-2-ヒドロキシメチル-1, 3-プロパンジオール、*N*-メチルメタクリルアミド、*N*-ビニルピロリドン及び他の、当業者に公知のものを含む。アクリルアミド、メタクリルアミド、*N*-イソプロピルアクリルアミド、2-ヒドロキシエチルアクリレート及び2-ヒドロキシエチルメタクリレートが特に有用であり、アミド基を含むモノマーが最も好ましい。

前記群(c)の有用な陰イオン性モノマーは、1個以上の負に帯電する基、例えばカルボキシ基、スルホ基、ホスホ基、スルフィノ基等を有するモノマー及び対応する塩を含む。モノマーは、1個以上のカルボキシ基を含むのが好ましい。代表的モノマーは、アクリル酸、メタクリル酸、イタコン酸、2-アクリルアミド-2-メチルプロパンスルホン酸、3-メタクリロイルオキシプロパ

ン-1-スルホン酸、ビニルスルホン酸及びこれらの酸のアルカリ金属塩及びアンモニウム塩並びにその他の、当業者に公知のものを含む。アクリル酸、メタクリル酸及びイタコン酸が特に有用である。

本発明の実施に有用な代表的ポリマーは、ポリ（スチレン-*co*-アクリルアミド-*co*-メタクリル酸）（85:10:5重量比）、ポリ（スチレン-*co*-メタクリルアミド-*co*-メタクリル酸）（85:10:5重量比）、ポリ（ビニルトルエン-*co*-*N*-イソプロピルアクリルアミド-*co*-イタコン酸）（65:20:15重量比）、ポリ（アクリル酸*n*-ブチル-*co*-スチレン-*co*-メタクリルアミド-*co*-メタクリル酸）（45:45:2:8重量比）、ポリ（メタクリル酸メチル-*co*-2-ヒドロキシエチルアクリレート-*co*-アクリル酸）（90:5:5重量比）、ポリ（アクリル酸*n*-ブチル-*co*-スチレン-*co*-アクリルアミド-*co*-メタクリル酸）（54:38:5:3重量比）、ポリ（アクリル酸*n*-ブチル

-*co*-スチレン-*co*-アクリルアミド-*co*-2-アクリルアミド-2-メチルプロパン-1-スルホン酸ナトリウム）（15:50:30:5重量比）、及びポリ（アクリル酸*n*-ブチル-*co*-スチレン-*co*-メタクリルアミド-*co*-2-アクリルアミド-2-メチルプロパン-1-スルホン酸ナトリウム）（20:45:30:5重量比）を含む。前記の最初のポリマーは、本発明に使用するのに好ましいポリマーである。

螢光標識の製造に使用する、充填可能なポリマーラテックスは、周知の乳化重合技術を用いて製造することができる。一般に、これらは、1種以上の適切な界面活性剤を含む水性媒体中に分散したモノマーの遊離基開始反応を使用して製造される。

本発明の、標識された、生理学的に反応性の種は、ポリマー粒子の表面上への種の吸収を容易にするため適当な時期（例えば72時間以内）に螢光標識を生理学的に反応性の種と混合することによって製造することができる。また、適当な反応

部位を生ずるように種及び粒子の一方又は両方を化学的に変性することによってポリマー粒子の表面に種を共有結合させることができる。代表的な標識種の製造の詳細を下記の例1に示す。

本発明の螢光標識された特異結合リガンドアナログは、特異結合免疫分析、特に、バックグラウンドから区別するため特殊な検出信号の一時的分離を利用する分析法に使用することができる。この免疫分析法においては、水性液体の試験試料を間欠的に励起し、寿命の長い螢光標識がなお強く発光しているが、他の螢光源は崩壊している暗サイクルの間だけ、情報を受理する。不連続的励起は、レーザーパルス、機械的チョッピング又は試料を励起ビームの内外に移動させる連続的励起ビーム等を含めて、種々の方法で達成することができる。一般に、螢光免疫分析技術は、文献に公知である。

本発明の実施において、標識リガンドアナログは、試験試料中の未知リガンドの量を示す。標識リガンドアナログの結合又は未結合断片を測

定することができる。特異結合分析を実施するため、必要に応じて、公知技術を使用し、結合したリガンド及び未結合のリガンドの物理的分離を実施することができる。

溶液分析においては、螢光標識された特異結合リガンドアナログは、一般に溶液1 μ 当たり1 μ 以下、好ましくは0.01 \sim 1 μ の濃度で存在する。測定すべきリガンド(又は被分析物)に対応するレセプターは、一般に溶液1 μ 当たり1 μ 以下、好ましくは $10^{-9} \sim 1$ gの量で存在する。他の物質、例えば緩衝剤、界面活性剤等を必要に応じて適当な量で含んでいてよい。

本発明のリガンドアナログ及び方法は、溶液分析及び乾式分析に適用することができる。リガンドアナログは、そのレセプターと一緒に、乾式又は溶液分析用の診断試験キットの一部として提供することができる。溶液分析には、キット成分を、所定量を有する個々の包装中の凍結乾燥試薬として供給することができる。また、これらを1回以上の分析に十分な大きさのびん又は包装に

入れた溶液として提供することができる。任意成分である他の試薬は、分析を実施するため適当な分析用具又は容器と一緒にキットとして供給することもできる。リガンドアナログを含む乾式分析要素(下記)を、診断用キットの一部として供給することもできる。

一般に、リガンドアナログ、対応するレセプター及びリガンド被分析物を含むと思われる試験試料を物理的に接触させ、適当な容器(例えば試験管、シャーレ、ビーカー、キューベット等)中で混合する。生ずる溶液を必要に応じて、一定時間(例えば0.5 \sim 4時間)37 $^{\circ}$ C以下の温度でインキュベーションしてリガンドアナログ及び試験試料中のリガンドとレセプターとの複合体の形成を促進させることができる。次に、結合した(即ち、複合体を形成した)又は未結合の(即ち、複合体を形成していない)標識の螢光を測定することによって試料を評価する。このような評価は、肉眼又は適当な螢光検出装置及び操作を用いて実施することができる。

本発明方法は、更に、本発明の標識された、生理学的に反応性の種を含む吸収性担持物質、即ち、自立性吸収性又は吸水性物質の薄いシート、例えばロ紙又はストリップからなる乾式分析要素を用いて利用することができる。このような要素は、適当な方法で固定された、分析前は、対応するリガンドアナログから分離されて保持された、特異結合分析用レセプターを含んでいてもよい。このような要素は、試験ストリップ、診断要素、浸漬スティック、診断剤等として公知である。

乾式分析要素に使用する場合、本発明のリガンドアナログを吸収又は含浸によって適当な吸収性担持物質中に混入するか、又は適当な吸収性物質上に被覆することができる。有用な担持物質は不溶性であり、水又は生理学的液体、例えば尿又は血清に触れたときにその構造的-一体性を保持する。有用な担持物質は、紙、多孔性粒状構造体、セルロース、多孔性ポリマーフィルム、木材、ガラス繊維、織布及び不織布(合成及び非合成)等から製造することができる。このような要素を製

造するため有用な物質及び操作は、例えば米国特許第3,092,465号、同第3,802,842号、同第3,915,647号、同第3,917,453号、同第3,936,357号、同第4,248,829号、同第4,255,384号及び同第4,270,920号明細書並びに英国特許第2,052,057号明細書により周知である。

本発明の乾式分析要素は、吸収性担持物質として少なくとも1個の拡散帯域を有するのが好ましい。この帯域は、自立性（即ち、その一体性を保持するのに十分に硬い物質から成る）であってよいが、別個の非多孔性支持体上に担持するのが好ましい。このような支持体は、任意の適当な寸法安定性の、好ましくは約200～約900nmの波長の電磁線を透過する透明な（即ち、放射線透過性の）物質であってよい。有用な支持体物質は紙、金属箔、ポリスチレン、ポリエステル（例えばポリ（エチレンテレフタレート））、ポリカーボネート、セルロースエステル（例えば酢酸セルロース）等を含む。

多孔性拡散帯域は、米国特許第4,292,272号、

同第3,992,158号、同第4,258,001号及び同第4,430,436号明細書並びに日本特公昭57（1982）-101760号公報に記載されているような、任意の適当な繊維状若しくは非繊維状物質又はその一方若しくは両方の混合物から製造することができる。拡散帯域は、等方性に多孔性（即ち、粒子、繊維、ポリマーストランド等の間の連続空間又は孔によって作られるように、帯域の各方向で多孔度が同一である）であるのが好ましい。

要素は、1個以上の試薬帯域、拡散帯域、記録帯域、媒染帯域、輻射線遮断若しくはフィルタ帯域、下塗帯域、バリヤ帯域、緩衝剤帯域等を含んでいてよい。帯域は、一般に、相互に液体接触している。このことは、液体、試薬及び反応生成物が、隣接帯域の重なる部分の間を通過しうることを意味する。帯域は別々に被覆された重なった層であるのが好ましいが、2以上の帯域が一つの層内の別個の領域であってもよい。

本発明の発光標識リガンドアナログは、要素の任意の帯域に混入することができる。また、こ

れを、要素にその後に施す試験試料に添加するか又はリガンドアナログを試験試料を含む要素に別個に（その後に又は同時に）添加することができる。測定すべきリガンドに対応するレセプターは、要素の任意の帯域に固定された形で存在するか、又は要素に試験試料と同時に添加することもできる。リガンドアナログ及びレセプターを要素に混入する場合には、これらを、分析を実施するまで、相互に隔てて保持しなければならない。

本発明の要素において、リガンドアナログの被覆量は広範囲に変動することができるが、一般に1g/m²以下、好ましくは10⁻²～1g/m²の被覆量で存在する。レセプターは、200g/m²以下、好ましくは40～200g/m²の被覆量で存在することができる。種々の他の望ましいが、任意成分の試薬及び添加剤が要素中に当業者に公知の量で存在することができる。このような物質は、反応試薬、界面活性剤、緩衝剤、結合剤、顔料、活性剤等を含む。

分析方法に応じて異なる種々の要素を本発明に

より製造することができる。要素を、任意の所望の幅の長いテープ、シート、スライド又はチップを含めて種々の形態に構成することができる。

本発明の分析は、手動で又は自動的に行うことができる。一般に、乾式要素を使用する際には、供給ロール、チップバケット又は他の供給源から要素を取り、これを、試験試料、試薬及びレセプターが要素内で混合されるように、レセプターの存在で試験すべき液体試料（例えば1～100μl）と接触させることによってリガンドを測定する。このような接触は、任意の適当な方法で、例えば、要素を試料中に浸漬又は含浸するか、又は適当な分散手段を用いて一滴の試料のスポットを手又は機械で要素に付ける。

試料を施した後、試験結果を得るのを促進又は容易にするため望ましい任意のコンディショニング処理、例えばインキュベーション、加熱等に要素をさらす。リガンドの測定は、結合した（即ち、複合体を形成した）又は未結合の（即ち、複合体を形成していない）標識リガンドアナログの螢

光を測定することによって達成される。

実施例

下記の実施例は、本発明の実施を説明するためのものである。これらの実施例において、物質は下記のようにして得られたものである：ICIアメリカ社(ICI Americas, Inc.、アメリカ合衆国デラウェア州ウィルミントン)からBRIJ 98 界面活性剤、オリン社(Olin Corp.、アメリカ合衆国コネチカット州スタンフォード)からサーファクタント(SURFACTANT) 10G 界面活性剤、マイルス・リサーチ・プロダクツ社(Miles Research Products、アメリカ合衆国インディアナ州エルカート)からウシガンマグロブリン、バイオラッド・ラボラトリーズ(Bio-Rad Laboratories、アメリカ合衆国カリフォルニア州リッチモンド)から1-シクロヘキシル-3-(2-モルホリノエチル)カルボジイミドメト-プ-ートルエンシルホネートを得、残りのものは、公知技術を用いて製造したか、又はイーストマン・オーガニック・ケミカルス(アメリカ合衆国ニューヨーク州ロチェ

スター)から得たものである。

例1： 螢光標識の製造

添加フラスコを装着した1ℓのフラスコ中でサーファクタント10G界面活性剤(1g)及び水(350ml)を緩和に攪拌しながら95℃に加熱した。添加フラスコ中でスチレン(85g)、アクリルアミド(10g)、メタクリル酸(5g)、 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$ (0.15g)及び H_2O (50ml)の混合物をサーファクタント10G界面活性剤(50%)1gを用いて十分に乳化し、内容物を常に攪拌しながら保持した。 $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ (0.75g)及び $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$ (0.15g)を反応フラスコ中に加え、次いで、直ちに乳化したモノマー混合物を添加することによって重合を開始させた。モノマーの添加は15~20分かけて行い、重合を更に2時間続けた。生ずる充填可能なラテックスを次いで室温に冷却し、口通した。蒸留水に対して約100時間透析した後、ラテックスは8.5%の凝固形分含有率、3.6のpH及び63.2 dyne/cmの表面張力を有することが判った。粒径は全く

均一(直径0.09~0.1 μm)であった。

溶解ポリマー及び余剰の界面活性剤をラテックスから除去するため、300,000の分子量をカットオフする膜を有する市販の透析装置を用いて透析/限外口過の操作を実施した。約100回、操作を行った後、ラテックスを限外口過によって凝固形分約8%に濃縮した。また、市販のベックマンの調製用超遠心分離を40000rpmで真空下に(5℃)、1時間作動し、上澄液をデカントして、遠心分離及び再分散の操作を数回繰り返すことによってラテックスを精製することもできる。ポリマー粒子を蒸留水で再分散し、操作を更に3回又は4回繰り返すことができる。下記の第1表は、分析した水相ポリマーに対する透析又は限外口過の作用を示す。

第1表

凝固形分%	水相ポリマー%	水相中のメタクリル酸%*
20.2(原)	2.07	0.35
13.1(透析後)	0.034	0

*水相中に溶解している遊離又は重合したメタクリル酸

前記の結果は、精製後には遊離メタクリル酸が水相にほとんど残っていないことを示す。

ユーロビウム-テノイルトリフルオロアセトネ-0.8695g(10^{-3} モル)及びトリオクチルホスフィンオキシド0.7732g(2×10^{-3} モル)をアセトンに溶かし、更にアセトンを用いて総重量を328.5gに調節することによって0.5重量%のユーロビウムキレートのアセトン溶液を製造した。

得られた溶液50gをアセトン20mlで希釈した。ポリマー5gを含む精製ラテックスを水で65.6gに希釈し、次いで緩和に攪拌しながら Eu^{3+} キレート溶液に添加した。その後、アセトンを真空下に60℃で除去した。粗い紙を通して口通した後、良好な分散液が得られた。凝固物は集められなかった。最終分散液の安定な螢光標識は、8.0重量%であった。

以下余白

例2: 別の螢光標識の製造

例1の操作により、固形分21.6%を有するポリ(スチレン-コ-メタクリルアミド-コ-メタクリル酸)(85:10:5重量比)の安定なラテックスを得た。ラテックスを固形分10%に希釈し、45000 rpmで遠心分離して、水相にメタクリル酸をほとんど含まない精製ラテックスを得た。ユーロピウムキレート为例1に記載した操作を用いてラテックス粒子中に導入して安定な螢光標識を得た。

例3: 標識リガンドアナログの製造

螢光標識チロキシンアナログの製造は、2工程操作を含む。即ち、L-チロキシン-ウシガンマグロブリン接合体を合成し、次いで、該接合体を例1で製造した螢光ラテックス標識に結合させる。

使用する成分のモル比に応じて、ハプテン:蛋白質の比を例えば1:1、2:1等に変動させて接合体を製造することができる。1:1比を有するハプテン:蛋白質接合体の説明を以下に記載す

N, N-ジメチルホルムアミド20ml中にチロキシン0.08g (1.0×10^{-4} モル)を添加した。0.3N水酸化ナトリウム溶液を用いて全部のチロキシンが溶解するまで攪拌混合物のpHを上昇させた。1-シクロヘキシル-3-(2-モルホリノエチル)カルボジイミドメト-p-トルエンスルホネート0.08g (1.9×10^{-4} モル)を攪拌した蛋白質溶液に添加したのち、チロキシン溶液を滴加した。反応混合物のpHを添加の間7.5~8.0に保持し、室温でpH7.5で24時間攪拌し、流れる蒸留水に対して48時間透析した。透析を1%ウシ血清アルブミン(BSA)溶液4ℓに対して24時間続け、次いで、流れる蒸留水に対して1時間続けた。凍結乾燥した接合体は0.85gであった。分光光度分析によりチロキシン:BGGのモル比は3と測定された。

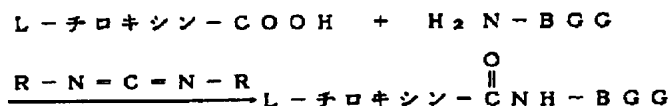
N, N-ジメチルホルムアミド40ml及び脱イオン水120mlから成る攪拌混合物中に接合体の試料0.4gを溶解させた。溶液をpH7.5の蒸留水4ℓ(8-アニリノ-1-ナフタリンスルホン酸

る。

L-チロキシン(T₄)とウシガンマグロブリン(BGG)とのモル比を市販のカリー(Cary)219型分光光度計での分光光度分析又は沃素分析によって測定した。沃素のパーセントは、反応活性化分析によって測定した。遊離チロキシンに関する液体クロマトグラフィー分析を市販のリクロソープ(Lichrosorb)11μRP8型4.6×250mmのカラムで移動相として2%磷酸及びアセトニトリルを用いて実施した。

A. T₄-BGGの直接結合

下記の等式によりアミド結合を形成させることによってL-チロキシンを直接BGGに結合させる:

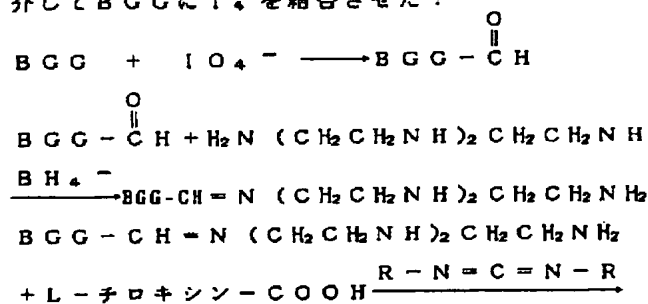


攪拌した脱イオン水300ml中にBGG1.0g (6.7×10^{-6} モル)を溶解させた。溶液のpHを0.3N水酸化ナトリウムで7.5に調節した。

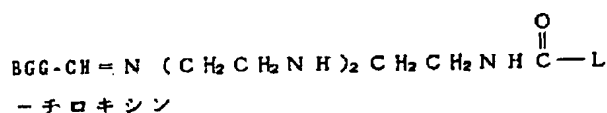
4.5gを含む)に対して48時間透析し、次いで流れる蒸留水に対して72時間透析した。透析物を凍結乾燥して、接合体0.37gを得た。チロキシン:BGG=1に対して、沃素の分析計算値は0.33である。分析実測値は0.22である。遊離チロキシン含有率は、液体クロマトグラフィー分析により0.1%未満と測定された。

B. BGGへのチロキシンの間接的結合

また、下記の等式によりBGGの炭水化物部分に結合したトリエチレンテトラミン連鎖延長剤を介してBGGにT₄を結合させた:



以下余白



酢酸ナトリウム緩衝液(0.1モル、pH8.0)
20ml中にBGG 0.5g (3.6×10^{-3} モル)を溶解させた。攪拌溶液にpH8.0の0.02モル過沃素酸ナトリウム溶液40mlを加えた。反応混合物を室温で3時間攪拌し、次いでエチレングリコール3mlを加え、攪拌を45分続けた。

反応混合物にトリエチレンテトラミン(2ml)を加え、攪拌を室温で72時間続けた。硼水素化ナトリウム(0.4g)を加え、攪拌を2時間続けた。反応混合物を流れる蒸留水に対して48時間透析した。

透析物を150mlに希釈し、1-シクロヘキシル-3-(2-モルホリノエチル)カルボジイミドメト-p-トルエンスルホネート0.06g (1.4×10^{-4} モル)を加えた。カルボジイミドを溶解した後、反応混合物のpHを0.3N水酸化ナトリウム溶液で7.5に調節し、N、N-ジメチル

で変動させた。ラテックスの表面上の未反応のカルボン酸基を、ラテックスと接合体との反応後にエタノールアミンで処理することによって遮断した。

pH7.7に調節した脱イオン水24ml中に、例1からの標識5.3ml(固形分8%、 3.2×10^{-3} モル)を添加した。攪拌懸濁液のpHを7.7に再び調節し、1-シクロヘキシル-3-(2-モルホリノエチル)-カルボジイミドメト-p-トルエンスルホネート0.0084g (1.9×10^{-5} モル)を添加し、次いでチロキシン-BGG 0.068g (4.5×10^{-7} モル)を添加した。反応混合物を11℃で48時間振盪した。エタノールアミン(0.1ml)を加え、振盪を24時間続けた。反応混合物を2.5×2.4cmのバイオゲル(Bio-Gel) A5Mクロマトグラフィーカラムに入れ、pH7の水で溶離した。クロマトグラフィーを繰り返した。溶離液をファットマン(Whatman) No.1口紙で2回口過し、市販の限外口過装置(0.05μm膜)で濃縮した。生成物を濃縮の間、pH7の水200

ホルムアミド(DMF)20mlに溶かしたチロキシン0.01g (1.2×10^{-5} モル)を滴加した(DMFにチロキシンを溶解させるのに0.3N水酸化ナトリウムの添加が必要であった)。添加の間、反応混合物のpHを希塩酸の添加により7.5に維持した。更に0.05gのカルボジイミドを添加し、反応混合物を室温で18時間攪拌した。反応混合物を蒸留水4ℓに対して48時間、次いで1%BSA溶液に対して72時間透析した。凍結乾燥した生成物は、0.39gであった。チロキシン:BGGのモル比2に対して沃素の分析計算値は0.67であった。分析実測値は0.56であった。

C. 螢光標識への接合体の結合

2:1又は1:1のチロキシン:BGG比を有する、直接結合した接合体を、蛋白質のアミノ基とラテックス上のカルボン酸基との間でアミド結合を形成させることによって例1の標識に結合させた。縮合剤としてカルボジイミドを使用した。

接合体:ラテックスのモル比を反応混合物中で下記の第II表に示したように17.5~140の間

mlで洗浄した(1回50mlずつ)。ラテックスの最終容量は、固形分1.9%を有する9mlであった。下記の第II表に、種々の接合体:ラテックスの比でラテックス粒子に接合体を結合させた結果を示す。

第II表

L-チロキシン-ウシガンマグロブリン(Bu ¹³) ラテックス標識					
チロキシン:BGG (モル:モル)	チロキシン-BGG :ラテックス-Bu ¹³ (モル:モル)	ラテックスの収率 (%)	沃素%		
			計算値	実測値	
2	140	36	0.23	0.10	
2	70	95	0.11	0.02	
2	35	97	0.06	0.04	
2	17.5	68	0.03	0.01	
1	140	65	0.23	0.02	
1	17.5	37	0.03	0.02	

以下空白

この免疫試薬をチロキシン-抗体と最適に反応させるには、アミノ酸分子で、蛋白質のその部分上にラテックス標識の表面と接触して存在するのはアミノ酸分子の全部ではないように、蛋白質上のチロキシン(抗原)を分布させる。遊離アミノ酸(蛋白質に共有結合していないアミノ酸)が免疫化学的反応を妨害するので、遊離L-チロキシンからの接合体の精製を実施した。

例4: 蛋白質の蛍光測定用の乾式試験要素

蛍光標識の使用を示すため、蛋白質被分析物(抗原)としてウシガンマグロブリン(BGG)を使用した。

標識へのBGGの結合

pH 7.7に調節した攪拌脱イオン水48ml中にウシガンマグロブリン(0.136g、 9×10^{-7} モル)を溶かした。攪拌溶液に1-シクロヘキシル-3-(2-モルホリノエチル)カルボジイミドメト-p-トルエンスルホネート(0.0168g、 3.9×10^{-3} モル)、次いで、例1からの標識(固形分8%)10.6mlを添加した。攪拌懸濁

液のpHを7.7に再調節し、混合物を11℃で24時間振盪した。

固体のウシ血清アルブミン(0.12g)を添加し、反応混合物を11℃で更に24時間振盪した。次いで、反応混合物を 2.5×2.5 cmのバイオゲルA 5 Mクロマトグラフィーカラムに通し、pH 7の水を用いてラテックスを溶離した。新しく調製したカラムを用いて、カラム操作を繰り返した。溶離液をファットマンNo 1口紙で2回口過し、市販の限外口過装置(0.05 μ m膜)で10mlに濃縮した。濃縮の間、pH 7の水200mlを1回に50mlセルに通した。最後の10mlは、7.2%の固形分を有することが判った。

要素の構造

抗-BGG抗体で被覆したポリスチレンビーズ(6.6g/ml)
支持体

前記の要素の試料1個に蛍光標識ラテックス5

μ gのスポットを付けた。別の要素試料には、0.2モルグリセリン-アセテート緩衝液(pH 7)5 μ gのスポットを付けた。残りの要素試料には、 10^{-3} モルの蛍光標識-BGGアナログ及び 10^{-4} ~ 10^{-9} モルの濃度のBGG(被分析物)のスポットを付けた。これらの要素試料を1~3分インキュベーションし、その後、各試料に0.2モルグリセリン-アセテート、0.1モルNaCl及び1.0%ブリジ(Brij; 商標)98界面活性剤を含むpH 7.0の洗浄液を約30秒施した。変形した市販のフェランド(Ferrand)蛍光計で遅延ルミネッセンスを用いて、結合した標識の蛍光を測定した。これらのデータから得た用量応答曲線は、標識だけのスポットを付けた要素試料が最高の蛍光を有し、他の要素においては、測定された蛍光がBGG被分析物の濃度が増加するとともに減少したことを示した。

例5: 安定性比較

この例は、米国特許第4,283,382号明細書(前記)に記載されているが、本発明の範囲には入

ない同様の標識リガンドと比べることによって本発明の標識リガンドの安定性が改良されていることを示す。この比較は、下記の方法で実施した。

ポリ(スチレン-コ-メタクリル酸)(95:5重量比)(ラテックス1)及びポリ(スチレン-コ-アクリルアミド)(90:10重量比)(ラテックス2)を使用して米国特許第4,283,382号明細書の教示により、蛍光標識(Eu^{3+} キレート)を製造した。例1で製造した本発明の標識をラテックス1及び2と比較した。3種の標識をすべて10℃で数ヶ月貯蔵し、その後、これらを安定性について評価した。

従来技術により製造した2種の標識(ラテックス1及び2)では、沈殿したラテックスの大きい凝集物が観察されたが、本発明の標識では、凝集物は実質的に観察されなかった。

(発明の効果)

希土類元素キレートを混入して含む蛍光標識及び標識種が水溶液中で極めて安定であることが判

明した。これらの物質は貯蔵中又は使用中に早期に凝集しない。これらは、特異結合分析に特に有用であるが、生理学的に反応性の種の標識付けが望ましい種々の生物医学的研究に使用することもできる。これらの標識は、蛍光分光法の使用に伴い、望ましい高感度を示す。本発明の物質の意外な、著しく改良された性質は、重合可能なエチレン性不飽和モノマーの特別な組み合わせにより製造したポリマーを使用したことから、達成されるものである。

特許出願人

イーストマン コダック カンパニー

特許出願代理人

弁理士 青 木 朗

弁理士 西 館 和 之

弁理士 石 田 敬

弁理士 山 口 昭 之

弁理士 西 山 雅 也

特許法第17条の2の規定による補正の掲載

手 続 補 正 書

昭和 61 年特許願第 58450 号(特開 昭 61-218945 号, 昭和 61 年 9 月 29 日 発行 公開特許公報 61-2190 号掲載)については特許法第17条の2の規定による補正があったので下記のとおり掲載する。 6 (1)

昭和 61 年 10 月 31 日

特許庁長官 黒 田 明 九 郎 殿

Int. Cl. 1	識別記号	庁内整理番号
G01N 33/545		A-7906-2G
C08F 8/00		7167-4J
C08G 81/00		2102-4J
G01N 33/543		J-7906-2G
		D-7906-2G

1. 事件の表示

昭和 61 年特許願第 58450 号

2. 発明の名称

安定な螢光希土類元素標識及びそれを用いた
測定方法 (新名称)

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

名称 イーストマン コダック カンパニー

4. 代理人

住所 〒105 東京都港区虎ノ門一丁目 8 番 10 号

静光虎ノ門ビル 電話 504-0721

氏名 弁理士 (6579) 青 木 朗

(外 4 名)



5. 補正の対象

- 1) 明細書の「発明の名称」の欄
- 2) 明細書の「特許請求の範囲」の欄
- 3) 明細書の「発明の詳細な説明」の欄

6. 補正の内容

- 1) 発明の名称を『安定な螢光希土類元素標識^{アンタイ ナイコウ ナド ンエイゲン ショウゴク}及びそれを用いた測定方法^{ホクサク}』に補正する。
- 2) 特許請求の範囲を別紙の通り補正する。
- 3) (イ) 明細書第 5 頁第 11~12 行「及び螢光標識された、生理学的に反応性の種」を削除する。
(ロ) 同第 5 頁第 12~13 行「これらの標識及び標識された種」を「この標識」に補正する。
(ハ) 同第 8 頁第 16 行~第 9 頁第 12 行「本発明は、更に、……アナログを含む。」を削除する。

7. 添付書類の目録

補正特許請求の範囲

1 通

2. 特許請求の範囲

1. 不連続相及び水相を有する充填可能なラテックスから誘導されたポリマー粒子を含み、不連続相が

(a) 疎水性で、重合可能なエチレン性不飽和モノマーから誘導された繰り返し単位 50~96 重量%、

(b) 非イオン性、親水性で、重合可能なエチレン性不飽和モノマーから誘導された繰り返し単位 2~30 重量%、並びに

(c) 少なくとも 1 個の可溶化基を含む陰イオン性で、重合可能なエチレン性不飽和モノマーから誘導された繰り返し単位 2~20 重量%

を含むポリマーから実質的に成るものである螢光標識。

2. A. リガンドに対するレセプターの存在下に、不連続相及び水相を有する充填可能なラテックスから誘導されたポリマー粒子を含む、螢光標識された免疫反応性リガンドアナログと液体試料とを接触させて、レセプターとリガンドアナロ

ーグとの複合体を形成させ、そして

B. リガンドアナログを蛍光分析により検出
することを含んで成り、

前記不連続相が

(a) 疎水性で、重合可能なエチレン性不飽和
モノマーから誘導された繰り返し単位 50 ~ 96
重量%、

(b) 非イオン性、親水性で、重合可能なエチ
レン性不飽和モノマーから誘導された繰り返し単
位 2 ~ 30 重量%、並びに

(c) 少なくとも 1 個の可溶化基を含む陰イオ
ン性で、重合可能なエチレン性不飽和モノマーか
ら誘導された繰り返し単位 2 ~ 20 重量%

を含むポリマーから実質的に成るものである、
水性液体中の免疫反応性リガンドの測定方法。